

P21675.A02



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

1600
X
1749
4/19/02
RECEIVED

MAR 05 2002

TECH CENTER 1600/2900

Applicant : Akira YAMAMOTO et al.

Group Art Unit: 1645

Serial No : 09/994,784

Examiner: Unknown

Filed : November 28, 2001

For : CARRIER HAVING IMMOBILIZED ANTIGENS OR ANTIBODIES AND
METHOD OF MANUFACTURING THEREOF

CORRECTION OF CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, DC 20231

RECEIVED
MAR 04 2002
IC 1700

Sir :

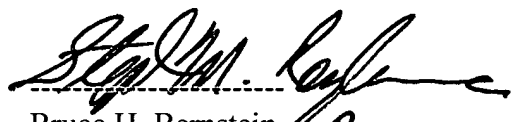
Pursuant to 35 U.S.C. § 119, applicants note that the Claim of Priority filed November 28, 2001 incorrectly claims priority of Japanese Application No. 2001-349447, filed November 14, 2001. Applicants hereby withdraw the claim of priority with respect to Japanese Application No. 2001-349447.

Accordingly, Applicants hereby claim the right granted pursuant to 35 U.S.C. § 119 based upon Japanese Application No. 2000-362762, filed November 29, 2000. As required by the Statute, a certified copy of the Japanese application is being filed concurrently herewith.

P21675.A02

Should there be any questions regarding the above or the present application, the Examiner is invited to contact the undersigned at the below-listed number.

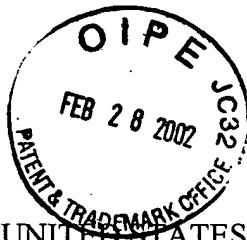
Respectfully submitted,
A. YAMAMOTO et al.



Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027
Reg. No. 31,796

February 28, 2002
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

P21675.P08



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Akira YAMAMOTO et al.

Serial No. : 09/994,784

Group Art Unit : 1645

Filed : November 28, 2001

Examiner

For : CARRIER HAVING IMMOBILIZED ANTIGENS OR ANTIBODIES AND METHOD OF MANUFACTURING THEREOF

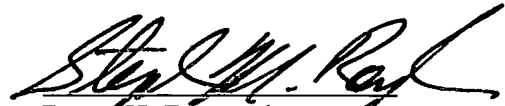
CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 2000-362762, filed November 29, 2000. As required by 37 C.F.R. 1.55, a certified copy of the Japanese application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,
Akira YAMAMOTO et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027 *Ry No 31,096*

February 28, 2002
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2000年11月29日

出願番号

Application Number:

特願2000-362762

出願人

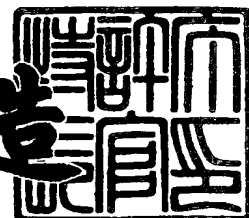
Applicant(s):

旭光学工業株式会社

2001年11月16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3100103

【書類名】 特許願

【整理番号】 12P173

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区前野町2丁目36番9号 旭光学工業株式会社内

【氏名】 山本 晃

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区前野町2丁目36番9号 旭光学工業株式会社内

【氏名】 菅生 健

【特許出願人】

【識別番号】 000000527

【氏名又は名称】 旭光学工業株式会社

【代表者】 松本 徹

【代理人】

【識別番号】 100091292

【弁理士】

【氏名又は名称】 増田 達哉

【電話番号】 3595-3251

【選任した代理人】

【識別番号】 100091627

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝比 一夫

【電話番号】 3595-3251

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007593

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9200540

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固定化抗原または抗体、および抗原または抗体の固定化方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも表面がリン酸カルシウムで構成された担体の表面に、抗原または抗体が固定された固定化抗原または抗体であって、

前記抗原または抗体は、前記担体に担持された抗リガンドと、前記抗原または抗体に結合したリガンドとを介して、前記担体に固定されていることを特徴とする固定化抗原または抗体。

【請求項 2】 少なくとも表面がリン酸カルシウムで構成された担体の表面に、抗リガンドを担持させる抗リガンド担持工程と、

前記抗リガンドと親和性を有するリガンドが結合した抗原または抗体を、前記担体に固定する固定工程とを有することを特徴とする抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 3】 前記固定工程を行った後、前記抗原または抗体を安定化させる工程を行う請求項 2 に記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 4】 前記担体を安定化剤で処理することにより、前記抗原または抗体を安定化させる請求項 3 に記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 5】 前記安定化剤は、グルタルアルデヒドである請求項 4 に記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 6】 前記固定工程を行った後に、前記担体の表面を被覆する工程を行う請求項 2 ないし 5 のいずれかに記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 7】 前記担体の表面にタンパク質を吸着させることにより、前記担体の表面を被覆する請求項 6 に記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 8】 前記タンパク質は、該タンパク質が保有する金属イオンを除去する処理が施されたものである請求項 7 に記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 9】 前記リガンドは、抗体の定常領域に結合している請求項 2 ないし 8 のいずれかに記載の抗原または抗体の固定化方法。

【請求項 10】 前記抗体は、I g G である請求項 2 ないし 9 のいずれかに

記載の抗原または抗体の固定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、固定化抗原または抗体、および抗原または抗体の固定化方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

リン酸カルシウムは、各種抗体を吸着する性質が知られている。このような性質から、リン酸カルシウムに抗体を吸着させたものは、様々な抗原抗体反応に供することができると考えられる。したがって、例えば、リン酸カルシウムからなる担体に抗体を担持させ、次いで、この担体に、かかる抗体に特異的な抗原を接触させると、凝集反応を起こすことが推測される。

【0003】

そこで、本発明者は、リン酸カルシウムで構成された担体に抗体を吸着させた後、かかる抗体に対する特異抗原を添加して、担体の凝集反応を試みた。

【0004】

しかし、単に担体に抗体を吸着させただけでは、抗体の抗原への結合能は低く、十分な凝集反応を起こすものではなかった。

【0005】

また、抗原を担体に単に吸着させた場合も、得られた固定化抗原では、抗体に対する結合能は低いものであった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、抗原等の吸着対象物への高い結合能を有する固定化抗原または抗体、および、抗原等の吸着対象物への高い結合能を維持しつつ抗原または抗体を担体へ固定可能な抗原または抗体の固定化方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

このような目的は、下記（１）～（１０）の本発明により達成される。

【0008】

（１） 少なくとも表面がリン酸カルシウムで構成された担体の表面に、抗原または抗体が固定された固定化抗原または抗体であって、

前記抗原または抗体は、前記担体に担持された抗リガンドと、前記抗原または抗体に結合したリガンドとを介して、前記担体に固定されていることを特徴とする固定化抗原または抗体。

本発明によれば、抗原等の結合対象物への高い結合能を有する固定化抗原または抗体を提供することができる。

【0009】

（２） 少なくとも表面がリン酸カルシウムで構成された担体の表面に、抗リガンドを担持させる抗リガンド担持工程と、

前記抗リガンドと親和性を有するリガンドが結合した抗原または抗体を、前記担体に固定する固定工程とを有することを特徴とする抗原または抗体の固定化方法。

これにより、抗原等の結合対象物への高い結合能を維持しつつ抗原または抗体を担体へ固定することができる。

【0010】

（３） 前記固定工程を行った後、前記抗原または抗体を安定化させる工程を行う上記（２）に記載の抗原または抗体の固定化方法。

これにより、固定化抗原または抗体は、経時的に劣化しにくくなる。

【0011】

（４） 前記担体を安定化剤で処理することにより、前記抗原または抗体を安定化させる上記（３）に記載の抗原または抗体の固定化方法。

安定化剤で担体を処理する方法は、簡易かつ最も効果的な抗原または抗体の安定化方法である。

【0012】

（５） 前記安定化剤は、グルタルアルデヒドである上記（４）に記載の抗原または抗体の固定化方法。

グルタルアルデヒドは、安定化剤として最適である。

【 0 0 1 3 】

(6) 前記固定工程を行った後に、前記担体の表面を被覆する工程を行う上記(2)ないし(5)のいずれかに記載の抗原または抗体の固定化方法。

これにより、リン酸カルシウムに吸着する性質を有する物質が固定化抗原または抗体に非特異的に結合することが、効果的に防止されるようになる。

【 0 0 1 4 】

(7) 前記担体の表面にタンパク質を吸着させることにより、前記担体の表面を被覆する上記(6)に記載の抗原または抗体の固定化方法。

タンパク質は、担体の被覆剤として好適である。

【 0 0 1 5 】

(8) 前記タンパク質は、該タンパク質が保有する金属イオンを除去する処理が施されたものである上記(7)に記載の抗原または抗体の固定化方法。

これにより、担体の表面を最適に被覆できるようになる。

【 0 0 1 6 】

(9) 前記リガンドは、抗体の定常領域に結合している上記(2)ないし(8)のいずれかに記載の抗原または抗体の固定化方法。

これにより、抗体は、抗原をより好適に結合できるようになる。

【 0 0 1 7 】

(10) 前記抗体は、IgGである上記(2)ないし(9)のいずれかに記載の抗原または抗体の固定化方法。

これにより、抗原の選択の幅が増大する。

【 0 0 1 8 】

【発明の実施の形態】

本発明者は、上記問題点について検討を重ねた結果、抗体の抗原結合部位が担体に吸着していることが上記問題の原因であると推論するに至った。すなわち、抗体を担体に単に吸着させただけでは、抗体の抗原結合部位が担体に吸着してしまい、抗体は抗原に対する十分な結合能が得られないのではないかと、本発明者は推論するに至った。したがって、本発明者は、抗体の抗原結合部位が担体に吸

着しないような状態で抗体を担体に固定できれば、抗体は抗原に対する高い結合能を保持しつつ、抗体を担体に固定できるのではないかと考えた。本発明は、かかる知見に基づくものである。

同様に、前述した固定化抗原においても、抗原が抗体に対して十分結合できない理由は、抗原の抗体に結合する部位が、担体に吸着していることが原因であると考えられる。

以下、本発明を好適実施形態に基づいて詳細に説明する。なお、以下の説明では、抗体を代表として説明するが、同様のことは、抗原についても言うことができる。

【0019】

本発明の固定化抗体（または抗原）は、抗体が担体に、かかる担体に担持された抗リガンドと、抗体に結合したリガンドとを介して、固定されてなるものである。

【0020】

本発明者は、上述した問題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、抗体を、抗リガンドとリガンドとを介して担体に固定することに到達した。これにより、抗体の抗原結合部位が担体に直接接触、吸着しにくくなり、抗体が有する抗原（結合対象物）への結合能が失われにくくなると考えられる。ゆえに、本発明によれば、抗原（抗体に対する特異的な抗原、すなわち特異抗原）に対して高い結合能を有する固定化抗体が得られる。

【0021】

ここで、本発明における担体の形状は特に限定されず、例えば球状、偏平形状とすることができる。担体が球状をなしていると、抗体を高い均一性で担体に担持することが容易となる。また、担体を球状とすると、凝集反応を肉眼で確認することが容易となる。また、担体を偏平形状とすると、担体が凝集し易いので、視認し易くなる。

【0022】

かかる担体の平均粒径は、1～100 μm 程度であることが好ましく、3～20 μm 程度であることがより好ましい。平均粒径をこの範囲内とすると、抗体の

高い担持能が得られ、かつ、凝集反応を好適に確認することができるようになる。

【0023】

また、本発明では、担体は、少なくとも表面がリン酸カルシウムで構成されている。本発明者は、リン酸カルシウムが抗リガンドを好適に吸着可能であることを発見した。また、リン酸カルシウムは凝集性に優れている。

【0024】

このような担体としては、例えば、リン酸カルシウムで構成されたビーズ、樹脂、セラミックス等で構成された球状の母材（ビーズ）の表面をリン酸カルシウムで被覆したものなどが挙げられる。特に、担体として、球状の母材の表面をリン酸カルシウムで被覆したものをを用いると、固定化抗体が凝集反応を起こすのに最適な密度に、担体の密度を調整することが容易となる。また、母材を樹脂で構成すると、表面をリン酸カルシウムで被覆することが容易となる。なお、母材の表面は染色されていてもよい。

【0025】

このような担体の密度は、 $0.7 \sim 2.0 \text{ g/cm}^3$ 程度とすることが好ましく、 $0.9 \sim 1.2 \text{ g/cm}^3$ 程度とすることがより好ましい。これにより、固定化抗体は、水中（もしくは水溶液中）で凝集反応を好適に起こすことができるようになる。特に、密度を後者の範囲内とすると、このような効果が顕著に得られる。

【0026】

本発明に用いられるリン酸カルシウムは、未焼成のものでも、焼結体（セラミックス）でもよいが、比表面積の大きい未焼成物あるいは比較的低温（ $200 \sim 900^\circ\text{C}$ ）で焼成したリン酸カルシウムが好ましい。

【0027】

また、本発明に用いられるリン酸カルシウムは、多孔質粒子であることが好ましい。担体が細孔を殆ど有さない緻密質である場合、担体の単位体積あたりの表面積が小さくなり、抗リガンド、抗体等の担持能が低下する場合がある。なお、リン酸カルシウムが多孔質粒子である場合、かかるリン酸カルシウムの細孔径（平均）は、 $0.001 \sim 1 \mu\text{m}$ 程度であることが好ましく、 $0.01 \sim 0.2 \mu\text{m}$

m程度であることがより好ましい。これにより、担体は、抗リガンド等に対する高い結合能が得られるようになる。また、同様の観点から、リン酸カルシウムの比表面積は、 $1 \sim 100 \mu\text{m}^2$ 程度とすることが好ましい。

【 0 0 2 8 】

なお、リン酸カルシウム（リン酸カルシウム系化合物）としては、例えば、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト等のアパタイト類、リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウム等が挙げられ、これらを1種または2種以上を混合して用いることができる。また、これらのリン酸カルシウムのなかでもCa/P比が1.0～2.0のものが好ましく用いられる。このようなリン酸カルシウムのうち、ハイドロキシアパタイトが最適である。ハイドロキシアパタイトは抗リガンド等の担持能および凝集能に秀でている。

【 0 0 2 9 】

本発明に用いられる抗リガンドには、担体に好適に吸着し、かつ、リガンドに好適に結合するものが好ましく用いられる。このような観点からは、抗リガンドとしては、アビジン（アビジン誘導体も含む）、ストレプトアビジン、レクチン、ホルモンなどが好適に用いられる。この中でも、抗リガンドとしては、アビジンが最適である。本発明者は、アビジンがリン酸カルシウムで構成された担体に極めて効率よく吸着することを発見した。加えて、アビジンは、リガンドとの結合能も高い。

【 0 0 3 0 】

また、本発明に用いられるリガンドには、抗体に好適に結合可能なものが好ましく用いられる。このような観点からは、リガンドとしては、ビオチン、プロテインA、プロテインGなどが好適に用いられる。その中でも、リガンドとしては、抗体との結合能が高く、かつ、抗体の活性を阻害しにくいので、ビオチンが最適である。

【 0 0 3 1 】

特に、本発明では、抗リガンドにアビジン、リガンドにビオチンの組み合わせを選択すると、極めて優れた効果が得られる。これは、アビジンがビオチンとの

結合部位を4箇所所有しているためと考えられる。このため、アビジンはビオチンを大量に結合することが可能であり、担体は、アビジンを介して大量の抗体を支持できる。

【0032】

なお、本発明には、IgG、IgM、IgA、IgE等、いずれの抗体を用いてもよい。その中でも、IgGを用いると、本発明の固定化抗体で検出等可能な抗原の種類が増大する。

【0033】

以下、このような固定化抗体の製造方法（抗体の固定化方法）を説明する。

【0034】

まず、固定化抗体を製造するに先立って、前述したような担体を用意する。

例えば、表面がリン酸カルシウムで構成された（被覆された）球状の担体は、後述する実施例のように、リン酸カルシウム粒子を母材に衝突させることにより、得ることができる。

【0035】

この場合、衝突させるリン酸カルシウム粒子の平均粒径を例えば0.1～50 μm 程度とすると、抗リガンドを好適に担持可能な担体を得ることができる。また、この場合、衝突させるリン酸カルシウムの見かけ密度は、1.5～2.5 g/cm^3 程度とすることが好ましい。これにより、固定化抗体が水中で好適に凝集反応を起こすように担体の密度を調整することが容易となる。

【0036】

[1] まず、担体の表面に、抗リガンドを担持させる。これは、例えば、担体と抗リガンド溶液とを混合すること等して、担体を抗リガンド溶液で処理することにより行うことができる。

【0037】

この場合、抗リガンド溶液の抗リガンド濃度は、0.001～100 mg/mL 程度とすることが好ましく、0.01～10 mg/mL 程度とすることがより好ましい。また、抗リガンド溶液中の抗リガンド量は、担体1 g あたり0.01～100 mg 程度とすることが好ましい。さらには、担体1 g あたりの抗リガンド溶液の体

積は、1～100mL程度とすることが好ましい。また、抗リガンド溶液のpHは、4～11程度とすることが好ましい。これにより、担体に抗リガンドを好適に担持させることができるようになる。

【0038】

〔2〕次に、担体の表面を被覆（ブロッキング）する。これは、例えば、担体と担体被覆剤溶液とを混合すること等して、担体を担体被覆剤（ブロッキング剤）溶液で処理することにより行うことができる。

【0039】

これにより、後述する工程〔4〕で抗体を担体に吸着させる際に、抗体が担体に非特異的に吸着すること（抗体がリガンドおよび抗リガンドを介さず直接担体に吸着すること）が好適に防止される。したがって、本工程を行うことにより、得られる固定化抗体では、抗体の抗原への結合能が向上する。

【0040】

なお、ブロッキング剤としては、リン酸カルシウムに吸着する性質を有し、かつ、抗体との相互作用が低い物質が好適に用いられる。このようなブロッキング剤としては、例えば、金属タンパク質（例えば、カゼイン、トランスフェリンなど）、アルブミン、ゼラチン等のタンパク質（抗体との相互作用が低いタンパク質）などが挙げられる。その中でも特に、ブロッキング剤としては、カゼイン等の金属タンパク質が好適である。金属タンパク質は、リン酸カルシウムへの吸着能が優れている。さらにその中でも、ブロッキング剤としては、カゼインが最適である。カゼインは、リン酸カルシウムへの吸着能が高く、かつ、抗体との相互作用が極めて低い。

【0041】

この場合、ブロッキング剤溶液のブロッキング剤濃度は、0.1～100mg/mL程度とすることが好ましく、1～50mg/mL程度とすることがより好ましい。また、ブロッキング剤溶液中のブロッキング剤量は、担体1gあたり1～1000mg程度とすることが好ましい。さらには、担体1gあたりのブロッキング剤溶液の体積は、1～100mL程度とすることが好ましい。また、ブロッキング剤溶液のpHは、4～11程度とすることが好ましい。これにより、担体を好適に被覆で

きるようになる。

【0042】

なお、ブロッキング剤に金属タンパク質等の金属イオンを保有するタンパク質を用いる場合、かかるブロッキング剤は、タンパク質が保有する金属イオンを除去する（減少させる）処理が施されたものであることが好ましい。これにより、ブロッキング剤による担体表面の被覆を、より完全に近いものとすることができる。このため、後述する工程〔4〕で抗体を担体に吸着させる際に、抗体が担体に非特異的に吸着することが極めて好適に防止される。しかも、得られた固定化抗体を用いて、タンパク質等、リン酸カルシウムに吸着する性質を有する物質の検出を行う場合、かかる物質が担体に非特異的に結合することも、好適に防止される。

【0043】

なお、タンパク質が保有する金属イオンを除去する方法としては、例えば、かかるタンパク質溶液（ブロッキング剤溶液）を、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等のキレート剤で処理する方法などが挙げられる。この場合、タンパク質溶液をキレート剤で処理する形態としては、例えば、タンパク質溶液にキレート剤を添加した後、例えばゲルろ過、限外ろ過、透析等により、かかるキレート剤をタンパク質溶液から除去する形態が挙げられる。

【0044】

〔3〕次に、担体に担持した抗リガンドを安定化させる。これは、例えば、担体と安定化剤（固定化剤）溶液とを混合すること等して、担体を安定化剤で処理することにより行うことができる。

【0045】

これにより、担体に担持した抗リガンドが安定化し、担体から抗リガンドが遊離することが防止されるようになる。このため、得られる固定化抗体は、経時的に劣化しにくくなる。

【0046】

なお、安定化剤としては、グルタルアルデヒド等の架橋剤、ホルムアルデヒド、シランカップリング剤等の結合剤、四塩化オスミウムなどが挙げられる。その

中でも特に、安定化剤としては、グルタルアルデヒドに代表される架橋剤が好適である。特に、グルタルアルデヒドを用いれば、抗リガンドを好適に安定化でき、かつ、抗リガンドが有するリガンドへの結合能も損ないにくい。

【 0 0 4 7 】

この場合、安定化剤溶液の安定化剤濃度は、0.01～100 mg/mL程度とすることが好ましく、0.1～10 mg/mL程度とすることがより好ましい。また、安定化剤溶液中の安定化剤量は、担体1 gあたり0.1～1000 mg程度とすることが好ましい。さらには、担体1 gあたりの安定化剤溶液の体積は、1～100 mL程度とすることが好ましい。また、安定化剤溶液のpHは、4～11程度とすることが好ましい。これにより、抗リガンドを好適に安定化できるようになる。

【 0 0 4 8 】

〔4〕次に、リガンドが結合した抗体を、担体に固定する。これは、例えば、リガンドが結合した抗体を含有する抗体溶液と担体とを混合すること等して、リガンドが結合した抗体を担体に接触させることにより行うことができる。

【 0 0 4 9 】

この場合、リガンドには、抗リガンドと親和性を有するものが用いられる。このようなリガンドは、抗リガンドと結合することができる。したがって、リガンドが結合した抗体を担体に接触させると、リガンドと抗リガンドとが結合し、これにより、抗体は担体に結合する。換言すれば、リガンドが結合した抗体を担体に接触させると、抗体は、リガンドと抗リガンドとを介して担体に結合することとなる。

【 0 0 5 0 】

なお、リガンドは、抗体の定常領域に結合していることが好ましい。リガンドが抗体の定常領域に結合していると、抗体を担体に結合させた際に、抗体の定常領域は担体に近いところに、また、抗体の抗原結合部位は担体から比較的離間したところに位置することとなる。このため、抗体の抗原結合部位近傍には、抗原抗体反応を行うのに十分な空間が確保されるようになる。加えて、抗体の抗原結合部位が担体に接触、吸着してしまうことも抑制される。したがって、リガンドが抗体の定常領域に結合していると、抗体は、抗原に、より好適に結合できるよ

うになる。

【0051】

この場合、抗体溶液の抗体濃度は、0.001～10mg/mL程度とすることが好ましく、0.01～10mg/mL程度とすることがより好ましい。また、抗体溶液中の抗体量は、担体1gあたり0.01～100mg程度とすることが好ましい。さらには、担体1gあたりの抗体溶液の体積は、1～100mL程度とすることが好ましい。また、抗体溶液のpHは、4～11程度とすることが好ましい。これにより、抗体を担体に好適に結合、固定できるようになる。

【0052】

【5】次に、担体の表面を被覆する。これは、前記工程【2】と同様にして行うことができる。この場合、好ましい被覆条件も、前記工程【2】と同様である。

【0053】

これにより、得られる固定化抗体では、タンパク質等のリン酸カルシウムに吸着する性質を有する物質が担体に非特異的に結合することが、好適に防止されるようになる。

【0054】

【6】次に、担体に固定した抗体を安定化させる。これは、前記工程【3】と同様にして行うことができる。この場合、好ましい被覆条件も、前記工程【3】と同様である。

【0055】

これにより、担体に固定した抗体が安定化し、担体から抗体が遊離することが好適に防止されるようになる。このため、得られる固定化抗体は、経時的に劣化しにくくなる。

【0056】

以上の工程を行うことにより、抗体は担体に固定化される。すなわち、固定化抗体が得られる。

【0057】

なお、上記工程【3】を行った後、上記工程【2】を行ってもよい。同様に、

上記工程〔6〕を行った後、上記工程〔5〕を行ってもよい。ただし、担体の表面を被覆した後、担体に対して安定化処理を施すと、担体を被覆したブロッキング剤が、担体から遊離しにくくなるという利点を得られる。なお、上記工程〔2〕、〔3〕、〔5〕、〔6〕は行わなくてもよい。

これら各工程〔1〕～〔6〕は、例えば、室温付近（0～40℃）で好適に行うことができる。

【0058】

なお、以上の説明では、抗体を代表として説明したが、同様のことは、抗原についても言える。

【0059】

【実施例】

（実施例）

以下のようにして、固定化抗体を得た。

【0060】

担体に抗体を固定するに先立って、まず、以下のようにして担体を用意した。

まず、ナイロンビーズ（平均粒径 $5\mu\text{m}$ 、密度 $1.03\text{g}/\text{cm}^3$ ） 50g と、焼結温度 900°C で焼結されたハイドロキシアパタイト粒子（ Ca/P 比 $=1.67$ 、平均粒径 $5\mu\text{m}$ 、比表面積 $45\text{m}^2/\text{g}$ 、みかけ密度 $1.8\text{g}/\text{cm}^3$ 、平均細孔径 $0.06\mu\text{m}$ ） 7.5g とを用意した。次に、これらナイロンビーズおよびハイドロキシアパタイト粒子を奈良ハイブリダイゼーションシステムNHS-1（奈良機械製作所製、定格動力 5.5kW 、定格電流 23A ）に投入し、この装置を 8000 回転/分、 $32\sim 50^\circ\text{C}$ で 5 分間稼働させた。これにより、表面がハイドロキシアパタイトで被覆されたナイロンビーズ（複合体粒子）を得た。なお、得られた複合体粒子は、平均粒径 $5.8\mu\text{m}$ 、密度 $1.13\text{g}/\text{cm}^3$ であった。また、かかる複合体粒子におけるハイドロキシアパタイト被覆層の厚さは、平均 $0.44\mu\text{m}$ 、平均細孔径は、 $0.06\mu\text{m}$ であった。

【0061】

以下に記載の操作は、すべて室温（ 20°C ）で行った。

担体に抗体を固定するに先立って、まず、下記工程<2>（および<5>）で

使用したカゼイン含有リン酸緩衝液中のカゼインに関して補足する。すなわち、下記工程<2>（および<5>）で使用したカゼイン含有リン酸緩衝液中のカゼインには、あらかじめカゼインが保有するカルシウムイオンを除去する処理を施しておいた。これは、次のようにして行った。①まず、カゼイン濃度40 mg/mLのカゼイン水溶液2.5 mLを用意し、これに、500 mM EDTA水溶液0.5 mLを添加した。これにより、カゼイン濃度4 mg/mL/EDTA濃度10 mMのカゼイン/EDTA混合水溶液25 mLを得た。なお、用意したカゼイン水溶液は、雪印乳業（株）製「ブロックエース」の濃度を調整することにより得たものである。②次に、この混合水溶液に対してゲルろ過クロマトグラフィーを行い、混合水溶液中からEDTAを除去した。また、かかるEDTAの除去とともに、カゼイン水溶液のバッファー交換を行った。（注：このとき、ゲルろ過クロマトグラフィーを行う前後で、混合水溶液および得られたカゼイン水溶液中のカルシウムイオン濃度を、それぞれ測定した。その結果、溶液中のカルシウムイオン濃度は、6分の1以下に減少していた。これにより、カゼインが保有するカルシウムイオンがほぼ除去されたことが確認された。なお、カルシウムイオンの濃度測定は、423 nmの吸光度を測定することにより行った。）③最後に、得られたカゼイン水溶液を濃縮して、カゼイン濃度を約10 mg/mLに調整した。

【0062】

<1>上記のようにして得られた複合体粒子0.1 gに、0.1 mg/mLアビジン含有リン酸緩衝液（pH 7.2）500 μ Lを添加した。

その後、かかる混合物を1時間静置した後、遠心分離して複合体粒子を回収した。そして、回収した複合体粒子をイオン交換水で洗浄した。

【0063】

<2>次に、この複合体粒子に、前述した方法で調製した約10 mg/mLカゼイン含有リン酸緩衝液（pH 7.2）500 μ Lを添加した。

その後、かかる混合物を1時間静置した後、遠心分離して複合体粒子を回収した。そして、回収した複合体粒子をイオン交換水で洗浄した。

【0064】

<3>次に、この複合体粒子に、1 mg/mLグルタルアルデヒド含有リン酸緩衝

液 (pH7.2) 500 μ L を添加した。

その後、かかる混合物を1時間静置した後、遠心分離して複合体粒子を回収した。そして、回収した複合体粒子をイオン交換水で洗浄した。

【0065】

<4>次に、この複合体粒子に、0.5 mg/mL ヤギ由来抗ヒトIgGビオチン標識抗体 (IgG) 含有リン酸緩衝液 (pH7.2) 500 μ L を添加した。なお、かかるIgG (American Qualex社製) は、IgGの定常領域にビオチンを結合させたものである。

その後、かかる混合物を1時間静置した後、遠心分離して複合体粒子を回収した。そして、回収した複合体粒子をイオン交換水で洗浄した。

【0066】

<5>次に、上記<2>と同様にして、複合体粒子の表面を、カゼインで被覆した。

【0067】

<6>次に、上記<3>と同様にして、複合体粒子に固定したIgGを安定化させた。

【0068】

これにより、表面がハイドロキシアパタイトで被覆されたナイロンビーズに、アビジンとビオチンとを介して、ヤギ由来抗ヒトIgG抗体 (IgG) が固定された固定化抗体を得た。

【0069】

(比較例1)

アビジンおよびビオチンを介さず、担体に直接抗体を担持させた固定化抗体を製造した。かかる固定化抗体は、下記のようにして製造した。

【0070】

まず、前記と同様の表面がハイドロキシアパタイトで被覆されたナイロンビーズを0.1 g用意した。

次に、この複合体粒子に、0.5 mg/mL ヤギ由来抗ヒトIgG抗体 (IgG) 含有リン酸緩衝液 (pH7.2) 500 μ L を添加した。なお、かかる抗体には、

ビオチンが結合していないものを用いた。

その後、かかる混合物を1時間静置した後、遠心分離して複合体粒子を回収した。そして、回収した複合体粒子をイオン交換水で洗浄した。その後、上記<5>、<6>と同様の操作を行った。

【0071】

(比較例2)

担体の表面にプロテインAを担持し、かかるプロテインAを介して抗体を担体に固定した固定化抗体を製造した。かかる固定化抗体は、下記のようにして製造した。

【0072】

まず、前記と同様の表面がハイドロキシアパタイトで被覆されたナイロンビーズを0.1g用意した。

次に、このビーズに対して、アビジン含有リン酸緩衝液の代わりに、0.1mg/mLプロテインA含有リン酸緩衝液を用いて、上記<1>と同様の操作を行った。その後、上記<2>、<3>と同様の操作を行った。

次に、この複合体粒子に、0.5mg/mLヤギ由来抗ヒトIgG抗体(IgG)含有リン酸緩衝液(pH7.2)500μLを添加した。なお、かかる抗体には、ビオチンが結合していないものを用いた。

その後、かかる混合物を1時間静置した後、遠心分離して複合体粒子を回収した。そして、回収した複合体粒子をイオン交換水で洗浄した。その後、上記<5>、<6>と同様の操作を行った。

【0073】

(コントロール)

表面がハイドロキシアパタイトで被覆されたナイロンビーズ(前述と同様のもの)の表面をカゼインで被覆した(上記<2>参照)後、かかるカゼインをグルタルアルデヒドで安定化した(上記<3>参照)だけのものを用意した。

【0074】

(評価)

実施例、比較例で得られた固定化抗体の抗原への結合能を測定した。

【 0 0 7 5 】

まず、実施例、比較例で得られた固定化抗体 1 mg を、1 万倍希釈したヒト血清 5 0 0 μ L に、それぞれ投入した。

次に、かかる液を 3 0 分間静置した後、遠心分離し、かかる液から固定化抗体を回収した。その後、かかる固定化抗体をイオン交換水で洗浄した。

【 0 0 7 6 】

次に、かかる固定化抗体を、0 . 0 0 0 5 mg/mL の H R P (Horse Radish Peroxidase) 標識抗ヒト I g G 抗体水溶液 5 0 0 μ L に、投入した。

次に、かかる液を 3 0 分間静置した後、遠心分離し、かかる液から固定化抗体を回収した。その後、かかる固定化抗体をイオン交換水で洗浄した。

【 0 0 7 7 】

次に、かかる固定化抗体に、2 mg/mL オーフエニレンジアミン (発色剤) 含有 0 . 0 2 % 過酸化水素水 5 0 0 μ L を添加し、室温で 3 0 分間発色反応させた。

【 0 0 7 8 】

その後、かかる液に 1 N 塩酸を 2 0 μ L 加えて発色反応を停止させ、4 5 0 nm の吸光度を測定した。

同様の操作を、上記 (コントロール) で得たナイロンビーズについても行った。

【 0 0 7 9 】

以上の結果を図 1 に示す。

図 1 から分かるように、各比較例で得られた固定化抗体には、抗原であるヒト血清由来の抗体は、ごくわずかしき吸着しなかった。一方、本実施例で得られた固定化抗体には、ヒト血清由来の抗体が大量に吸着していた。これは、本実施例で得られた固定化抗体では、担体に担持した抗体の抗原結合部位が担体に直接吸着することが防止され、これにより抗体の抗原に対する結合能があまり低下しなかったためと考えられる。

【 0 0 8 0 】

以上の結果から、本実施例で得られた固定化抗体は、抗原への高い結合能を有していることが確認された。

【 0 0 8 1 】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明によれば、結合対象物への高い結合能を維持しつつ、抗原または抗体を、担体へ固定することができる。したがって、本発明によれば、結合対象物への高い結合能を有する固定化抗原または抗体を得ることができる。そして、かかる固定化抗原または抗体を用いれば、抗原等の結合対象物を高感度で検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

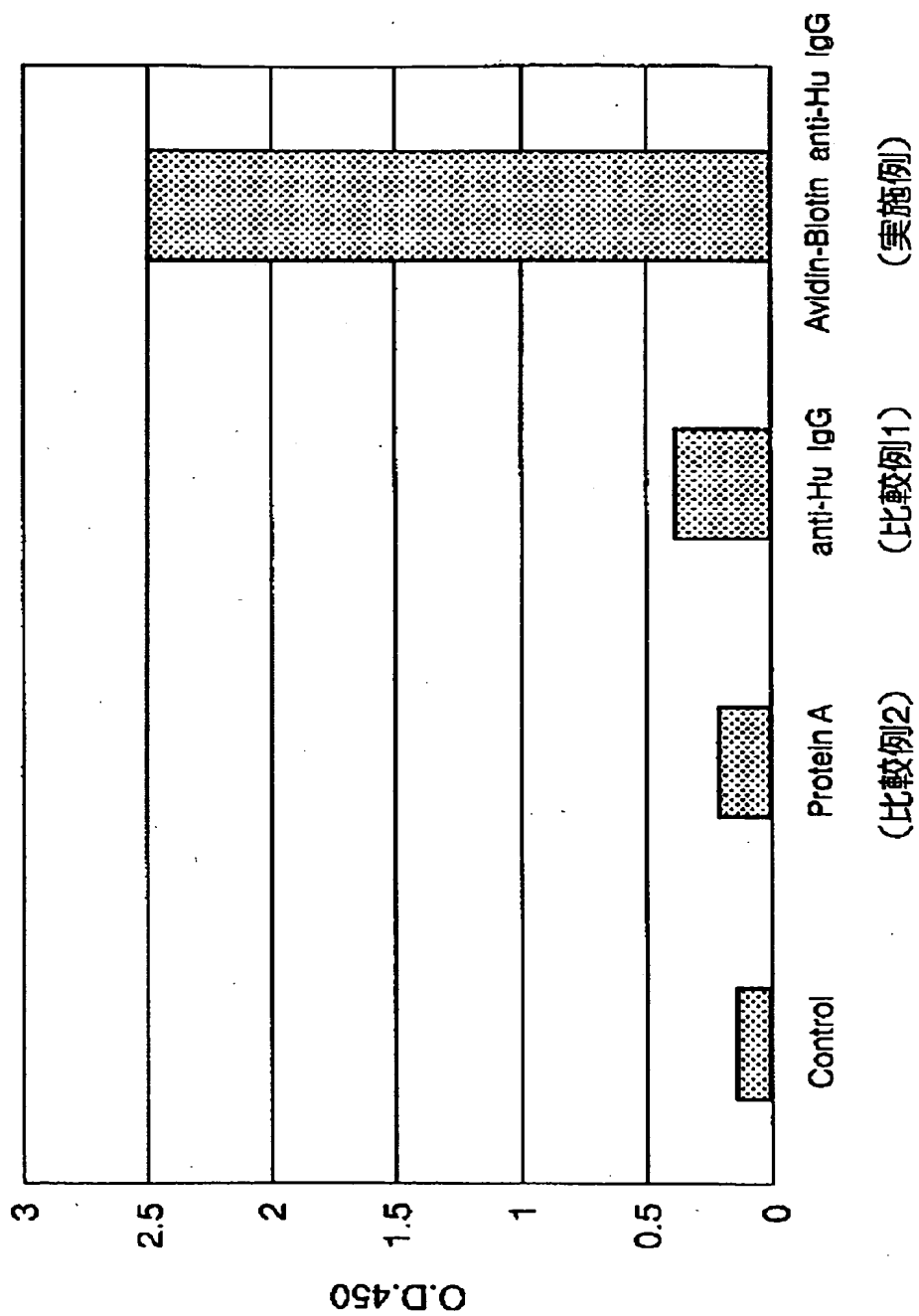
【図 1】

実施例および比較例で得られた各固定化抗体に対する抗原の吸着量を示すグラフである。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗原への高い結合能を維持しつつ抗体を担体へ固定可能な抗体の固定化方法を提供すること。

【解決手段】 抗体は、次に示す工程を得ることにより担体に固定される。①まず、表面がリン酸カルシウムで構成された球状の担体の表面に、アビジン等の抗リガンドを担持させる。②次に、担体の表面をカゼイン等で被覆する。③次に、担体に担持した抗リガンドを、グルタルアルデヒド等で処理することにより安定化させる。④次に、ビオチン等のリガンドが結合した抗体を、担体に固定する。⑤次に、担体の表面を被覆する。⑥次に、担体に固定した抗体を安定化させる。

【選択図】 なし

特2000-362762

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-362762
受付番号	50001536630
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年11月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年11月29日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000527]

1. 変更年月日	1990年 8月10日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都板橋区前野町2丁目36番9号
氏 名	旭光学工業株式会社